



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Petrović

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Sinteza i svojstva levotiroksina

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2019.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

15. svibnja 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

6. rujna 2019.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD	1
1.1. O Levotiroksinu	1
<i>1.1.1. Štitna žlijezda i hormoni štitne žlijezde.....</i>	<i>1</i>
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....	2
2.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva levotiroksina	2
2.2. Farmaceutska primjena.....	4
<i>2.2.1. Levotiroksin kao farmaceutski preparat.....</i>	<i>4</i>
<i>2.2.2. Indikacije, upozorenja i moguće nuspojave</i>	<i>5</i>
2.3. Biosinteza levotiroksina	6
2.4. Prva sinteza levotiroksina.....	10
<i>2.4.1. Sinteza DL-tiroksina</i>	<i>10</i>
<i>2.4.2. Rezolucija DL-tiroksina</i>	<i>13</i>
2.5. Razvoj sinteze – kako poboljšati iskorištenje?	16
<i>2.5.1. Sinteza levotiroksina iz 3,5-dijodtirozina.....</i>	<i>16</i>
<i>2.5.2. Sinteza levotiroksina iz L-tirozina.....</i>	<i>19</i>
<i>2.5.3. Moderniji pristup sintezi levotiroksina</i>	<i>20</i>
2.6. Proizvodnja levotiroksina na industrijskoj skali	25
2.7. Dejodiranje levotiroksina	27
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVIII

§ Sažetak

Levotiroksin je važan hormon štitne žlijezde i njegov nedostatak u ljudskom organizmu može dovesti do ozbiljnih metaboličkih i psihičkih poremećaja. U slučajevima hipotireoze, levotiroksin se primjenjuje kao lijek, kao zamjenska terapija za inače prirodno sintetizirani hormon u organizmu. Upravo zbog toga pojavila se potreba za laboratorijskom sintezom levotiroksina i optimizacijom farmaceutskog preparata za najjedostavniju primjenu kod pacijenata. Bolesti štitne žlijezde su u porastu među ženama i muškarcima svih dobi, stoga ne čudi sve veća potreba za lijekovima ovog tipa. Na hrvatskom tržištu levotiroksin je prisutan u obliku natrijeve soli i pod zaštićenim imenom Euthyrox®.

U uvodu je kratko opisana štitna žlijezda i hormoni koje ona izlučuje, kao i struktura levotiroksina te njegova fizikalno-kemijska svojstva. Navedene su i karakteristike samog farmaceutskog preparata uz indikacije za primjenu te moguće nuspojave.

Dan je prikaz biosinteze levotiroksina kao i razvoj laboratorijske sinteze tijekom godina. Obrađeni su i problemi s kojima su se znanstvenici susretali prilikom pokušaja sinteze i poboljšanja uvjeta i iskorištenja. Objašnjena je i rezolucija racemičnog tiroksina uz navedene pokuse koji su dokazali aktivnost L-izomera (levotiroksina) u organizmu. Prve sinteze činile su jednostavnije reakcije, ali uz loša iskorištenja zbog puno uzastopnih koraka sinteze i nedovoljno razvijenih metoda izolacije i pročišćavanja. Moderniji pristup sintezi ulazi u složenije reakcije pregradnji i oksidacija uz nužan molekulski kisik. Navedene su i metode prilagođene za sintezu na industrijskoj skali. Konačno, ukratko je objašnjeno dejodiranje levotiroksina kojim nastaje trijodtironin (T_3), drugi važan hormon štitne žlijezde koji također nosi dio fiziološke aktivnosti u organizmu.

§ 1. UVOD

1.1. O Levotiroksinu

1.1.1. Štitna žlijezda i hormoni štitne žlijezde

Štitna žlijezda je endokrina žlijezda, nalazi se na prednjoj strani vrata, a sastoji se od dva režnja što joj daje prepoznatljiv leptirasti oblik. Glavna funkcija štitne žlijezde je lučenje hormona koji sadrže jod (levotiroksin, T_4 i trijodtironin, T_3) te peptidnog hormona kalcitonina.¹

Mehanizam izlučivanja hormona štitne žlijezde složen je proces. Stanice hipotalamusa izlučuju tireostimulirajući hormon (TRH). TRH se izlučuje u kapilare hipofiznog kanala koji povezuje hipofizu i hipotalamus te na taj način hormon dopire u hipofizu. TRH potiče sintezu i izlučivanje hormona tireotropina (TSH). TSH se zatim krvlju prenosi iz hipofize u štitnu žlijezdu gdje potom stimulira reakcijski put posredovan adenilil ciklazom kako bi se pojačala sinteza hormona T_3 i T_4 . Izlučivanje tih hormona regulirano je mehanizmom povratne sprege: veće koncentracije T_3 i T_4 inhibiraju sintezu TRH u hipotalamusu kao i djelovanje TRH u hipofizi, čime efektivno inhibiraju i izlučivanje TSH. Dodatno, štitna žlijezda ima vlastiti sustav autoregulacije koji je ovisan o TSH. Mehanizmi autoregulacije uglavnom su povezani s koncentracijom joda u organizmu. Velike koncentracije joda inhibiraju organifikaciju jodida (Wolff-Chaikoff blok). Wolff-Chaikoff blok otkrili su Jan Wolff i Israel Lyon Chaikoff 1948. godine, a radi se o smanjenom izlučivanju hormona štitne žlijezde uzrokovano konzumiranjem prekomjerne količine joda.² Kod nekih bolesti, to može dovesti do inhibicije sinteze hormona štitne žlijezde i hipotireoze.³ Jedan od primjera je *Hashimoto thyroiditis* – kronična, autoimuna upala štitne žlijezde koja napredovanjem uzrokuje uništenje štitnjače. Prvi ga je opisao japanski liječnik Hakaru Hashimoto 1912. godine, po kojem nosi i ime.⁴

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Struktura i fizikalno-kemijska svojstva levotiroksina

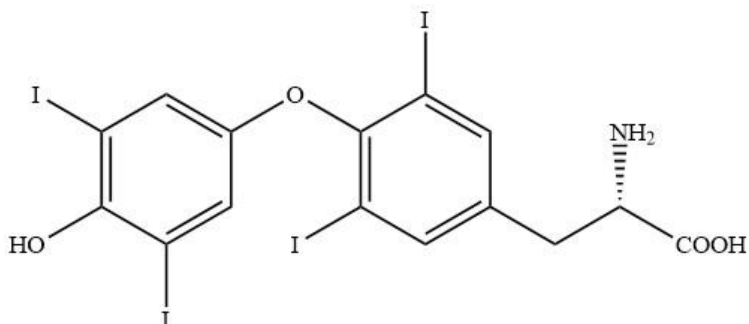
Levotiroksin, L-tiroksin, tetrajodtironin, T_4 , (1), punog imena (2S)-2-amino-3-[4-(4-hidroksi-3,5-dijodfenoksi)-3,5-dijodfenil]propanska kiselina, jedan je od hormona štitne žlijezde i neophodan je za optimalan rast, razvoj, funkciju i održavanje svih tjelesnih tkiva.¹ Levotiroksin je glavni hormon štitne žlijezde, sintetizira se u molarnom omjeru 99,9 : 0,1 u odnosu na trijodtironin.³ Tome je razlog što trijodtironin lako nastaje dejodiranjem levotiroksina u organizmu. Hipertireoza je bolest do koje dolazi ako štitna žlijezda pretjerano luči levotiroksin, a hipotireoza je bolest do koje dolazi ako je sinteza levotiroksina smanjena i njegova koncentracija nije dostatna za normalno funkcioniranje organizma. U tablici 1. prikazan je utjecaj nedovoljne koncentracije levotiroksina na značajnije sustave organizma.³

Tablica 1. Utjecaj nedovoljne koncentracije levotiroksina na organizam.³

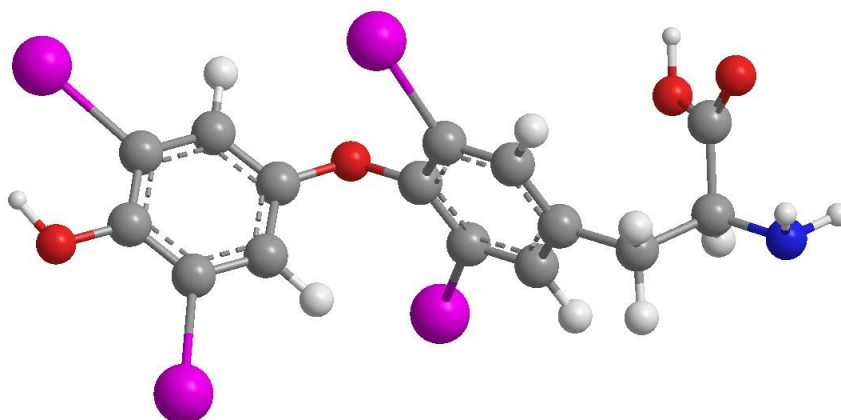
Sustav organizma	Simptomi hipotireoze
Kardiovaskularni sustav	- povećana periferna vaskularna otpornost, smanjen broj otkucaja srca, nizak krvni tlak
Respiratorni sustav	- zadržavanje CO_2 , hipoventilacija, pleuralni izljevi
Središnji živčani sustav	- letargija, općenito smanjena mentalna procesivnost, neuropatije
Metabolički sustav	- smanjem bazalni metabolizam, usporena razgradnja inzulina, povišen kolesterol i trigliceridi u krvi, smanjena razgradnja hormona, usporen metabolizam lijekova

Struktura levotiroksina prikazana je na slikama 1 i 2. Levotiroksin sadrži četiri atoma joda koji su ključni za njegovu funkcionalnost. Gubitkom jednog atoma joda nastaje trijodtironin koji u organizmu nosi većinu fiziološke aktivnosti. Levotiroksin ima tri donora vodikove veze i pet akceptora vodikove veze (atomi $-NH_2$, $-COOH$ i $-OH$ skupina). Molarna masa levotiroksina iznosi 776,687 g/mol. Pri sobnoj temperaturi je krutina, u obliku igličastih kristala ili bijelog

praha. Tali se na 253,5°C, a pri toj temperaturi se i raspada uz oslobađanje toksičnih para. Slabo je topljiv u vodi, a netopljiv u etanolu i benzenu.⁵

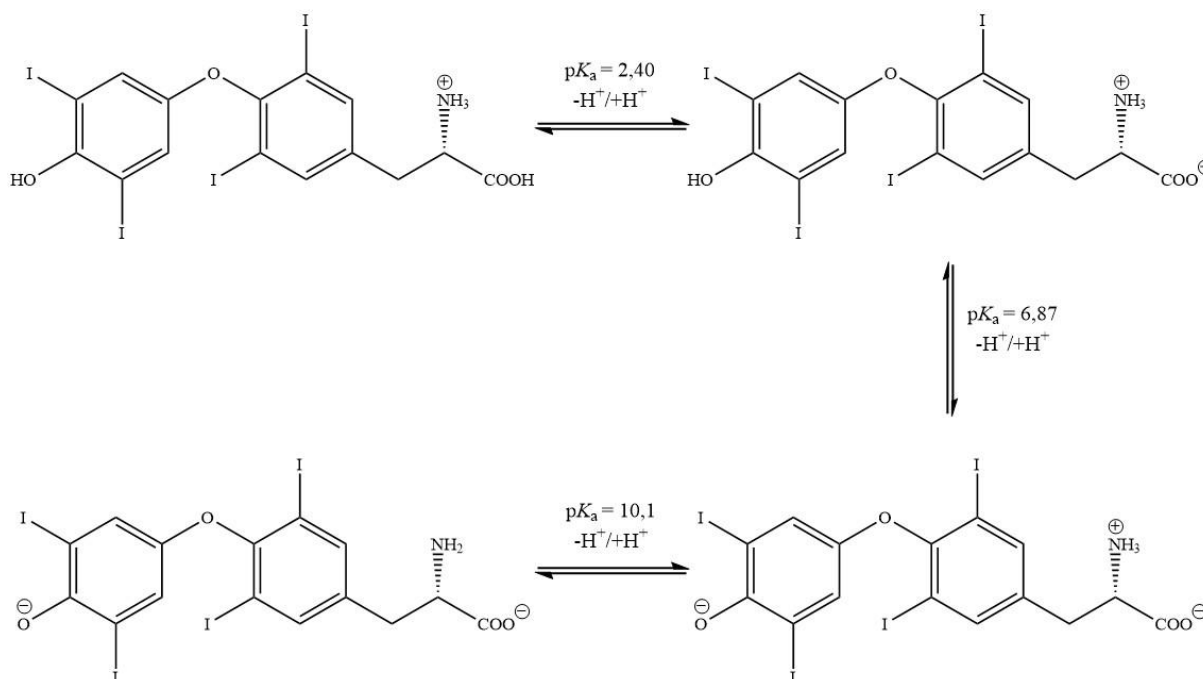


Slika 1. Levotiroksin, T₄.



Slika 2. 3D struktura levotiroksina, optimizirana metodom MM2.

Levotiroksin ima četiri ionske forme i može postojati kao kation, zwitterion, anion i dianion ovisno o pH otopine u kojoj se nalazi. Ionizacija levotiroksina prikazana je shemom 1. pK_a vrijednosti funkcionalnih skupina iznose 2,40 za karboksilnu skupinu, 6,87 za OH (fenolnu) skupinu i 10,1 za amino skupinu. Topljivost levotiroksina u vodi smanjuje se s povećanjem pH od 1 do 3, ne mijenja se u području pH 3-7 i značajno se povećava iznad pH ~ 7.¹



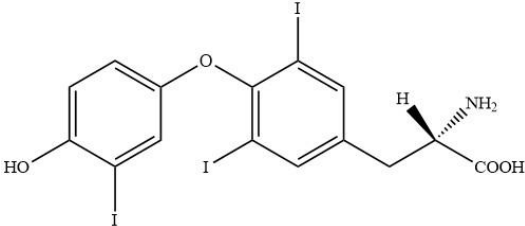
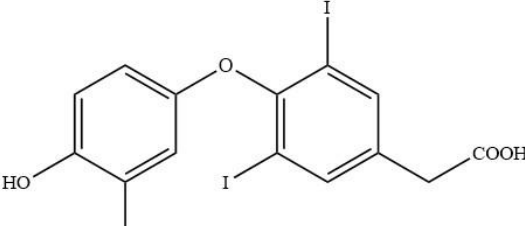
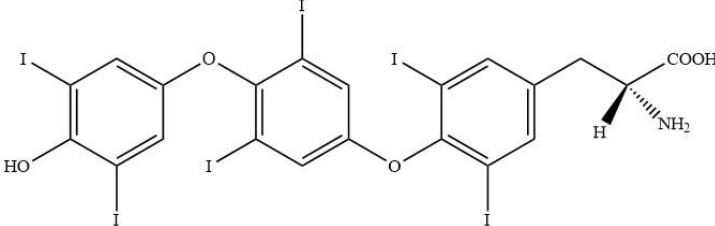
Shema 1. Ionizacija levotiroksina od potpuno protoniranog do potpuno deprotoniranog oblika.

2.2. Farmaceutska primjena

2.2.1. Levotiroksin kao farmaceutski preparat

Sintetski levotiroksin je lijek koji se gotovo isključivo koristi u terapiji bolesti štitne žlijezde, primarno kao zamjena za prirodni levotiroksin kod hipotireoze. Lijek je od izbora zbog svoje stabilnosti, jedinstvenosti sadržaja, niske cijene, odsutstva stranih alergenijskih proteina, jednostavnosti laboratorijskih mjerenja koncentracije u serumu i dugog vremena poluraspada u organizmu (~ 7 dana), što omogućava primjenu jednom dnevno. Dodatno, levotiroksin se u organizmu spontano prevodi u trijodtironin i zapravo primjena levotiroksina rezultira administracijom oba hormona.³ Kao farmaceutski preparat koristi se natrijeva sol – levotiroksin natrij koji obično kristalizira s pet molekula vode, ali sadržaj vode može varirati. Levotiroksin natrij je gotovo bijela ili smeđe-žućkasta, blago higroskopna praškasta krutina, jako slabo topljiva u vodi, slabo topljiva u 96%-tnom etanolu, a vrlo dobro topljiva u razrijeđenim otopinama alkalijskih hidroksida. Identifikacija se obično vrši IR spektroskopijom ili spektrometrijom masa. U čistom obliku čuva se zaštićen od svjetla u zatvorenoj posudi na temperaturi od $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dozvoljen sastav određenih nečistoća prikazan je u tablici 2.⁶

Tablica 2. Dozvoljen sastav nečistoća u farmaceutskom preparatu levotiroksin natrij.⁶

Struktura	Udio/%
	1
	0,2
	0,5

2.2.2. Indikacije, upozorenja i moguće nuspojave

Levotiroksin kao farmaceutski preparat predstavlja sintetski hormon štitne žlijezde za liječenje bolesti i poremećaja rada štitne žlijezde, a ima jednak učinak kao i prirodni hormon. Koristi se za liječenje benigne eutiroidne gušavosti kod pacijenata s normalnom funkcijom štitne žlijezde, za sprječavanje ponovne pojave gušavosti nakon operacije, kao nadomjestak prirodnog hormona štitne žlijezde kada ga ona ne proizvodi dovoljno (hipotireoza), za potiskivanje ponovne pojave tumora kod pacijenata s karcinomom štitne žlijezde i za uspostavljanje ravnoteže hormona štitne žlijezde kada se pojačano lučenje hormona liječi antitiroidnim lijekovima. Individualnu dozu određuje liječnik na temelju dijagnostičkih laboratorijskih testova i kliničkog pregleda. U pravilu, liječenje se započinje niskom dozom koja se povećava svaka 2-4 tjedna, do postizanja pune individualne doze. Potrebno je često kontrolirati razinu hormona u krvi.⁷

Lijek nije dozvoljeno koristiti u slučaju alergije na djelatnu tvar, neliječenog poremećaja nadbubrežne žlijezde, hipofize ili pojačanog lučenja hormona štitne žlijezde kao i akutnih

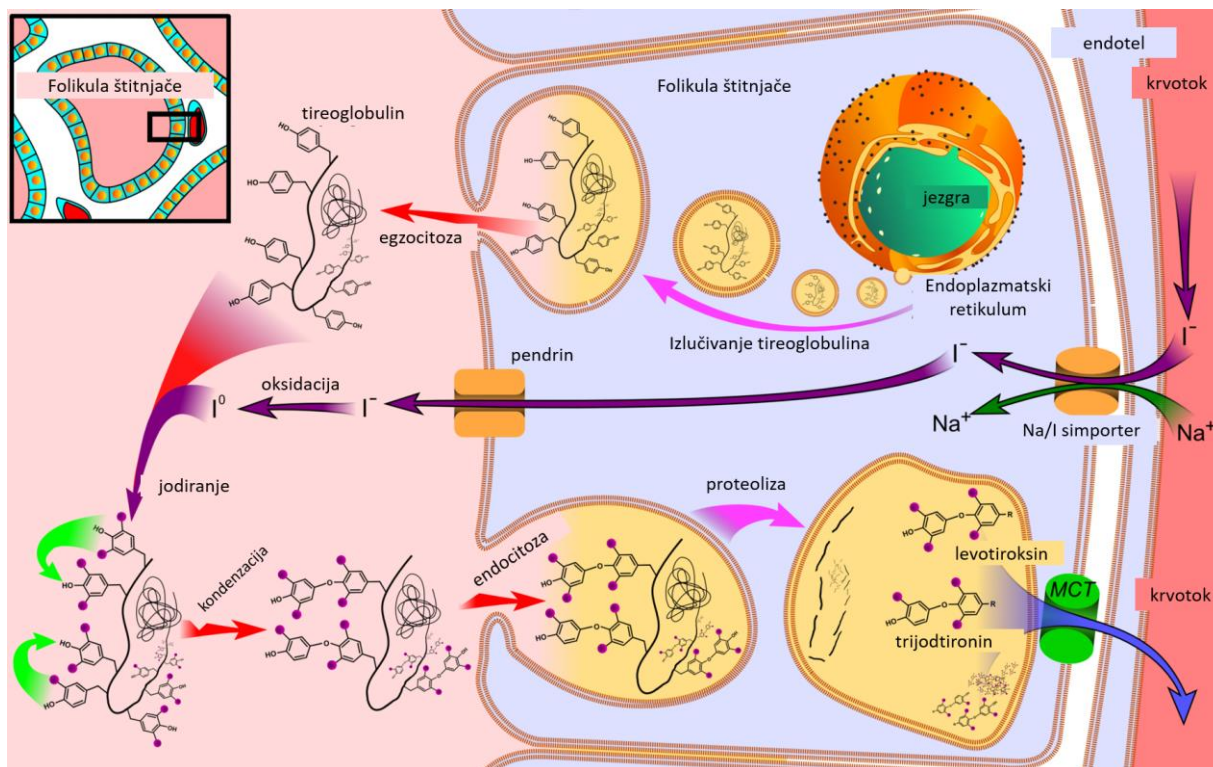
bolesti srca (infarkt miokarda ili upala srca). Potreban je oprez u slučaju da pacijent boluje od visokog krvnog tlaka, angine pektoris ili ubrzanog i nepravilnog rada srca.⁷

Levotiroksin može uzrokovati nuspojave, ali se one ne pojavljuju kod svih osoba. Neke od nuspojava koje se mogu pojaviti su: nepravilni i ubrzani otkucaji srca, bol u prsima, glavobolja, iznenadno crvenilo, vrućina, povraćanje, menstrualni poremećaji, drhtavica, nesanica, pojačano znojenje i slično.⁷

2.3. Biosinteza levotiroksina

Iako je štitna žlijezda kao organ poznata već više stotina godina, prvo izvješće koje povezuje hipotireozu s uništenjem navedene žlijezde objavilo je Medicinsko društvo u Londonu 1888. godine. Postojanje hormona koji sadrži jod prvi je predvidio Baumann 1895. godine. Tek 1919. godine Kendall je prvi izolirao hormon alkalnom hidrolizom svinjske štitne žlijezde i nazvao ga tiroksin. Kendall je uspio izolirati 7 g kristaličnog produkta i odredio mu empirijsku formulu $C_{15}H_{11}O_3NI_3$, za koju se kasnije ispostavilo da nije točna. Harrington i suradnici koristili su enzimsku hidrolizu za izolaciju tiroksina iz štitne žlijezde svinje i odredili točnu empirijsku formulu izoliranog tiroksina: $C_{15}H_{11}O_4NI_4$. Oni su odredili i točnu strukturu izoliranog produkta nakon dugotrajne analize, a zatim i nezavisne sinteze. Slično strukturno objašnjenje ponudio je i Foster, koji je koristio kombinaciju kemijske i enzimске hidrolize za izolaciju slobodnog hormona. Foster je svinjsku štitnu žlijezdu prvo podvrgnuo kiseloj hidrolizi i zatim kratkoj enzimskoj digestiji.¹

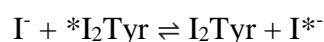
Biosinteza levotiroksina kontinuirano se istraživala desetljećima, a točan mehanizam ovog biokemijskog procesa još nije potpuno razjašnjen. 1927. godine, Harrington i Barger predložili su da levotiroksin nastaje kondenzacijom dvije molekule 3,5-dijodtirozina.⁸ Zatim, 1939. godine von Mutzenbecher izvještava kako inkubacija bazične otopine 3,5-dijodtirozina rezultira jako malom količinom levotiroksina.⁹ Predložena su dva moguća mehanizma za sintezu levotiroksina *in vivo*: intra- i intermolekulska kondenzacija. Biosinteza levotiroksina u štitnoj žlijezdi katalizirana je tiroidnom peroksidazom (TPO) i prikazana na slici 3. Anorganski jod u organizam ulazi pretežno kao jodid, I^- . Nakon ulaska u folikule štitne žlijezde preko Na^+/I^- simportera TPO oksidira jodide u atomski jod I ili jodov(I) kation I^+ . Jod se zatim inkorporira u tireoglobulin za daljnju sintezu hormona. Ovaj proces nije specifičan, ne postoji međuprodukt koji je vezan za enzim nego se jodiranje vrši preko reaktivnih vrsta joda koje TPO otpušta.^{10,11}

Slika 3. Shematski prikaz biosinteze hormona štitnjače.¹²

Slobodni 3,5-dijodtirozin ima dva suprotna efekta na reakcije katalizirane tiroidnom peroksidazom: inhibicija jodiranja tireoglobulina i stimulacija sinteze hormona štitne žlijezde. Provedeni su mnogi eksperimenti koji pomažu u razumijevanju biosinteze levotiroksina, a navedeni su samo neki od njih.

1.) Inhibicija jodiranja tireoglobulina katalizirana tiroidnom peroksidazom uočena je pri koncentracijama 3,5-dijodtirozina višim od $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$. Promatrane su reakcije *in vitro* pri 20°C i koncentracijama slobodnog 3,5-dijodtirozina od $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ do 1 mmol dm^{-3} , $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ joda i $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tireoglobulina. Iz kinetičkih mjerenja vidljivo je da pri koncentraciji od 1 mmol dm^{-3} slobodni 3,5-dijodtirozin jako inhibira jodiranje tireoglobulina, dok pri nižim koncentracijama dolazi do manjeg stupnja inhibicije. Također, promatran je odnos početnih brzina reakcije u prisutnosti različitih koncentracija joda. Rezultati su pokazali da slobodan 3,5-dijodtirozin kompetitivno inhibira jodiranje tireoglobulina. Konstanta inhibicije K_i određena je iz Dixonovog prikaza kinetičkih podataka i iznosi $7,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 3,5-dijodtirozina.¹³

2.) Kada se slobodan 3,5-dijodtirozin inkubira s tiroidnom peroksidazom bez prisutnosti jodida nema značajne reakcije, međutim, u prisutstvu jodida dolazi do reakcije zamjene između atoma joda prisutnih u molekuli 3,5-dijodtirozina i jodida iz medija. Koristeći ^{14}C obilježen 3,5-dijodtirozin izolirani su i nejodirani ^{14}C , produkti što pokazuje da u manjem stupnju dolazii do dejodiranja. Međutim, derivati tirozina obilježeni s ^{14}C bilo bez ili s jednim atomom joda nisu zapaženi. Reakcija zamjene je dakle direktna i ne utječe na korake jodiranja ili dejodiranja i vrijedi:



Detaljnije, ^{125}I ili ^{14}C obilježen 3,5-dijodtirozin ($2\ \mu\text{mol dm}^{-3}$) inkubiran je na 20°C u prisutnosti TPO bez ili sa $100\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ jodida u periodu od 30 minuta. Produkti inkubacije analizirani su tankoslojnom kromatografijom i mjereni kao postotak inkubiranog supstrata. Rezultati su prikazani u tablici 3.¹³

Tablica 3. Produkti inkubacije 3,5-dijodtirozina u prisutnosti TPO.¹³

Supstrat	100 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ otopina I^-	Produkti		
		3,5-dijodtirozin	I^-	nepoznat
		%		
$[\text{}^{125}\text{I}]$ 3,5-dijodtirozin	-	100	0	0
$[\text{}^{125}\text{I}]$ 3,5-dijodtirozin	+	60	40	0
3,5-dijod $[\text{}^{14}\text{C}]$ tirozin	-	100	0	0
3,5-dijod $[\text{}^{14}\text{C}]$ tirozin	+	65	-	35

Vidljivo je da kad jodidi nisu prisutni, ^{125}I obilježen 3,5-dijodtirozin nije se dejodirao niti razgradio. U prisutnosti $100\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ otopine jodida, 40% jodidnih iona 3,5-dijodtirozina zamijenjeno je. ^{14}C obilježen 3,5-dijodtirozin također je izoliran netaknut nakon inkubacije s tiroidnom peroksidazom u odsutstvu jodida. Međutim, nakon inkubacije sa $100\ \mu\text{mol dm}^{-3}$ jodida izolirano je samo 65% 3,5-dijod $[\text{}^{14}\text{C}]$ tirozina. 35% radioaktivnih obilježja izolirano je u obliku dva nepoznata produkta. Primjećeno je i da ne dolazi do nastanka ^{14}C obilježenog jodtirozina i tirozina.¹³

3.) Slobodan 3,5-dijodtirozin prisutan u niskim koncentracijama ne utječe na reakciju jodiranja, ali primjetno potiče sintezu tiroidnih hormona. Proveden je eksperiment u kojem su kinetička mjerenja provedena na tireoglobulinu inkubiranom tiroidnom peroksidazom, jodidom i u prisutosti ili odsutnosti slobodnog 3,5-dijodtirozina. Početna brzina sinteze levotiroksina povećala se čak dva puta uz prisutstvo $0,2 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 3,5-dijodtirozina. Primjećen je pad broja atoma joda prisutnih u promatranim dijodtirozinskim ograncima nakon 10 minuta inkubacije. Ukupan broj atoma joda smanjio se za dva. Ovo se može objasniti kondenzacijom dva 3,5-dijodtirozina u levotiroksin zato što se uočilo da su dva atoma joda pronađena u sastavu hormona nakon istog perioda inkubacije. Pokazano je da niska koncentracija 3,5-dijodtirozina djeluje stimulirajuće i na sintezu levotiroksina i na sintezu 3,5,3'-trijodtironina.¹³

Kemijski model biosinteze levotiroksina proučavali su mnogi znanstvenici i svoje teorije bazirali na tome da derivat slobodnog 3,5-dijodtirozina, dijdihidroksifenilpiruvat kondenzira lako s 3,5-dijodtirozinskim ograncima na tireoglobulinu. Međutim, nastajanje tog derivata katalizirano je s barem još dva enzima: transaminazom i tautomerazom. Prilikom transformacije 3,5-dijodtirozina u levotiroksin dolazi do kondenzacije fenolnih skupina dvije molekule 3,5-dijodtirozina i gubitka jedinice od tri ugljikova atoma. Johnson i Tewkesbury pretpostavili su da se radi o piruvatu, ali to nije bio univerzalan zaključak. Mislilo se da se radi i o alaninu, serinu, hidroksipiruvatu ili dehidroalaninu. Sih i suradnici nedavno su pokazali da se zapravo radi o semialdehidu aminomalonske kiseline. Zaključak je da i intra- i intermolekulska kondenzacija mogu postojati u biosintezi levotiroksina.¹

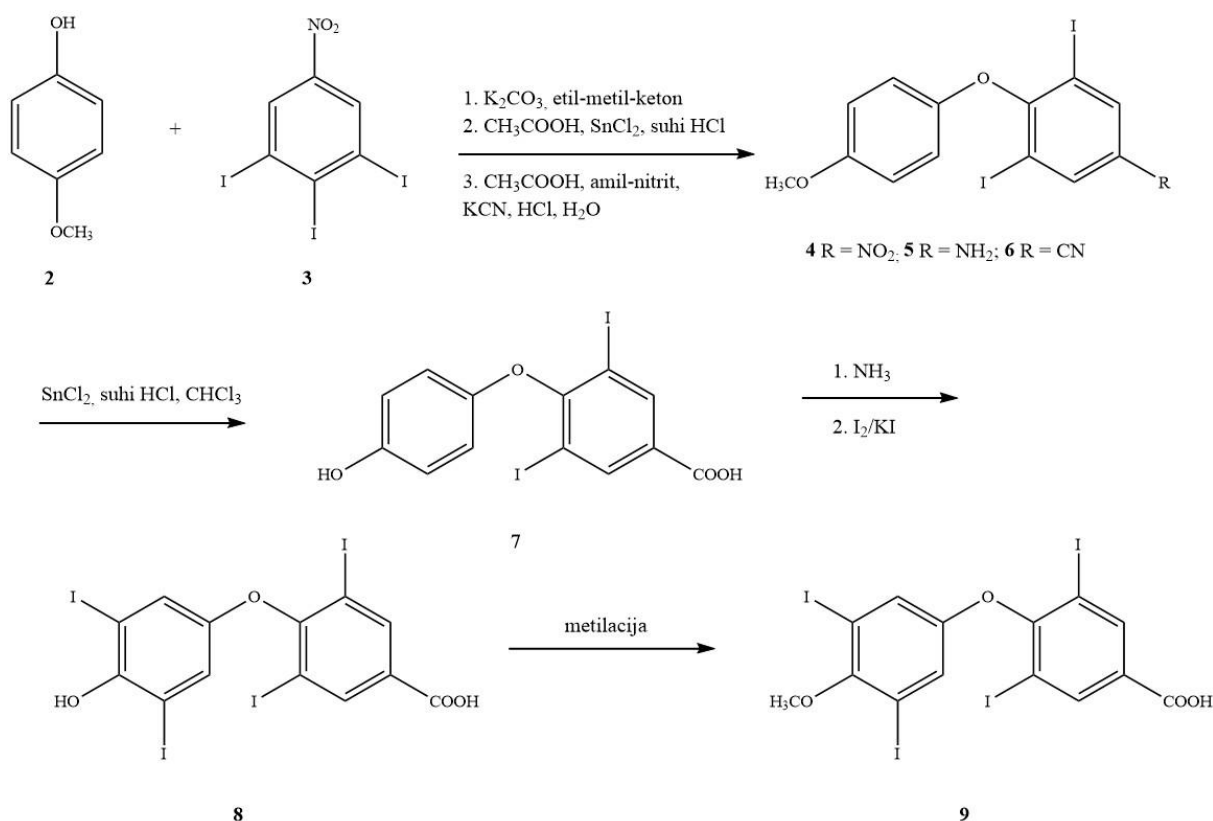
2.4. Prva sinteza levotiroksina

2.4.1. Sinteza DL-tiroksina

Levotiroksin su prvi sintetizirali Charles Robert Harington i George Barger 1927. godine. U to vrijeme znali su da je levotiroksin tetrajod-derivat *p*-hidroksifenilnog etera tirozina.¹ Točan položaj atoma joda nije bio poznat. Za uspješnu sintezu prvo je bilo potrebno sintetizirati 3,5-dijod-4'(3',5'-dijod-4'-metoksifenoksi)benzojevu kiselinu, spoj za kojeg je bilo poznato da ga mogu koristiti za daljnju sintezu ciljane molekule levotiroksina.¹⁴ Ubrzo je otkriveno kako direktnim jodiranjem nije moguće uvesti više od dva atoma joda u molekulu *p*-hidroksifenilnog etera tirozina. Željeni tetrajodfenilni eteri mogu se dobiti samo uvođenjem atoma joda (ili nekih drugih skupina koje mogu biti zamijenjene jodom) na položaje 3 i 5, prije nastanka samog fenilnog etera. Drugim riječima, atomi joda (ili zamjenjive skupine) moraju biti prisutni u *ortho* položaju u odnosu na halogeni atom ili fenolnu skupinu koja će sudjelovati u kondenzaciji. U prvim eksperimentima pokušali su kondenzaciju različitih *p*-nitrohalogenbenzena s 3,5-dijod-4-hidroksibenzojevom kiselinom. Blagi uvjeti, kao što su zagrijavanje reaktanata u piridinu ili kuhanje u acetonu uz kalijev karbonat, rezultirali su samo izolacijom nepromijenjenih početnih spojeva. Nešto jači reakcijski uvjeti uz dodatak bakra rezultirali su potpunom eliminacijom dva atoma joda koja su već bila prisutna u molekuli.⁸

Poznato je da halogeni atom postaje bolja izlazna skupina ako je na benzenskom prstenu prisutna i nitro skupina. Najizraženiji je utjecaj na halogeni atom u *para* položaju, nešto manji na halogeni atom u *ortho* položaju, dok na *meta* položaj nema utjecaja. U skladu s tom činjenicom ustanovljeno je da bi se jod na položaju 4 u 3,4,5-trijodnitrobenzenu preferentno eliminirao i da je moguća kondenzacija ove molekule s fenolom pri čemu nastaje 3,5-dijod-4-fenoksinitrobenzen u dobrom iskorištenju. Reakcija je ponovljena s *p*-metoksifenolom (**2**) i 3,4,5-trijodnitrobenzenom (**3**) uz K₂CO₃ u metil-etil-ketonu kao otapalu, pri čemu je nastao 3,5-dijod-4(4'-metoksifenoksi)nitrobenzen (**4**), prvi značajniji produkt i moguć prekursor za sintezu 3,5-dijod-4(4'-metoksifenoksi)benzojeve kiseline. Nastali 3,5-dijod-4(4'-metoksifenoksi)nitrobenzen zatim je reduciran do odgovarajućeg anilinskog derivata **5** uz SnCl₂ i suhi HCl. Provedena je Sandmeyerova reakcija: amino skupina transformirana je u cijano skupinu pri čemu je nastao odgovarajući nitril **6**. Miješanjem nastalog nitrila **6** s jodovodičnom i octenom kiselinom uz zagrijavanje reakcijske smjese do vrenja došlo je do spontane hidrolize i demetilacije spoja, dobivena je 3,5-dijod-4(4'-hidroksifenoksi)benzojeva kiselina (**7**). Spoj je zatim otopljen u koncentriranoj

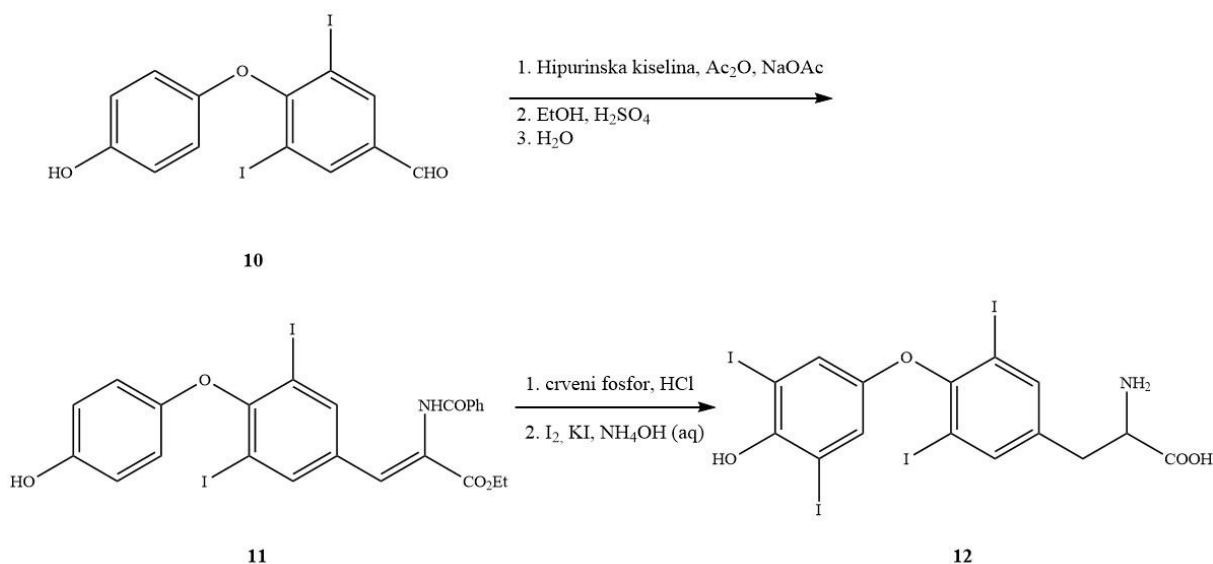
otopini amonijaka i u tu otopinu dodan je jod u kalijevom jodidu. Jod se trenutačno iskoristio u reakciji i nastala je 3,5-dijod-4(3',5'-dijod-4'-hidroksifenoksi)benzojeva kiselina (**8**) koja je metilacijom dala 3,5-dijod-4(3',5'-dijod-4'-metoksifenoksi)benzojevu kiselinu (**9**). Iskorištenje reakcije bilo je dobro i nastalo je dovoljno konačnog produkta. Ova serija eksperimenata odredila je položaj atoma joda u tiroksinu i prikazana je shemom 2.⁸



Shema 2. Sinteza 3,5-dijod-4(3',5'-dijod-4'-metoksifenoksi)benzojeve kiseline (**9**).

Za samu sintezu levotiroksina otkriven je bolji polazni spoj: 3,5-dijod-4(4'-metoksifenoksi)benzaldehyd (**10**), kojeg je sintetizirao Stephen 1925. godine.¹⁵ Znanstvenici su naišli na dva problema: bazična redukcija navedenog aldehyda nije bila moguća jer bi prilikom reakcije došlo do eliminacije atoma joda, a dugo zagrijavanje spoja u jodovodičnoj kiselini uz crveni fosfor također se pokazalo neuspješnim. Prva uspješna reakcija bila je kondenzacija 3,5-dijod-4(4'-metoksifenoksi)benzaldehyda s imidazolidin-2,4-dionom, koja je provedena zagrijavanjem reakcijske smjese jedan sat uz katalitičku količinu crvenog fosfora i jodovodičnu kiselinu te zatim hidrolizom nastalog spoja

koncentriranom otopinom barijeva hidroksida. Međutim, međuprodukti reakcije bili su jako teško topljivi, što je otežavalo pročišćavanje pa su iskorištenja bila jako loša. Nakon još nekoliko neuspješnih pokušaja, konačno su optimizirani uvjeti za uspješnu sintezu koja je prikazana shemom 3. 3,5-Dijod-4(4'-metoksifenoksi)benzaldehyd kondenziran je s hipurinskom kiselinom i zatim preveden u odgovarajući ester **11** pomoću etanola i sumporne kiseline. Ester je zatim grijan u jodovodičnoj kiselini uz crveni fosfor. Produkt, β -[3,5-dijod-4(4'-hidroksifenoksi)]fenil- α -aminopropanska kiselina, dobiven je u 25%-tnom iskorištenju. Navedeni spoj zatim je otopljen u amonijaku i podvrgnut jodiranju pomoću I₂/KI. Konačni produkt ove sinteze, β -[3,5-dijod-4(3',5'-dijod-4'-hidroksifenoksi)]fenil- α -aminopropanska kiselina (**12**), po svojim kemijskim i fizikalnim svojstvima identičan je levotiroksinu izoliranom iz štitne žlijezde.⁸



Shema 3. Prva sinteza racemičnog tiroksina (**12**).

2.4.2. Rezolucija DL-tiroksina

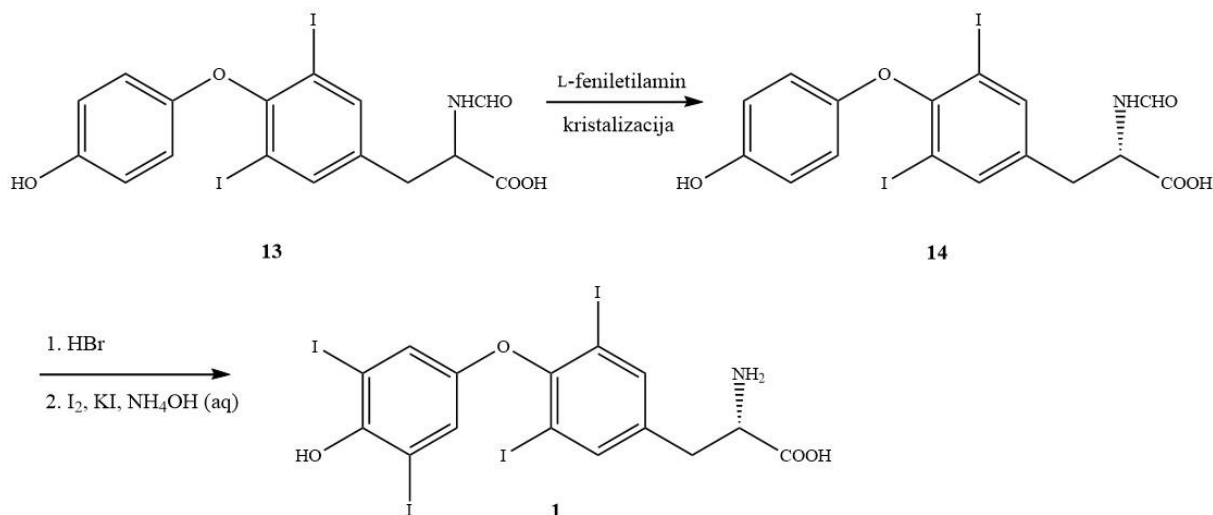
Izolacijom hormona iz štitne žlijezde, kao i kemijskom sintezom u laboratoriju, svaki put bi se dobila racemična smjesa DL-tiroksina. Činjenica da je tzv. prirodni tiroksin kakvog su poznavali zapravo DL-spoj olakšala je kemijsku i fizikalnu identifikaciju spoja. Međutim, znanstvenici su pretpostavljali kako u organizmu tiroksin postoji samo kao jedan optički aktivan izomer i kako je samo taj jedan zaslužan za fiziološku aktivnost. Uočili su razliku između fiziološke aktivnosti tiroksina i mase fiziološkog materijala štitne žlijezde koja sadrži ekvivalentne količine joda. Zaključili su da ako je jedan izomer tiroksina u organizmu znatno više fiziološki aktivan, jedino objašnjenje za dobivanje racemata jest da je tiroksin prilikom sinteze ili izolacije umjetno racemiziran jer racemizacijom tiroksin može izgubiti i do 50% fiziološke aktivnosti, ovisno o relativnom udjelu dvaju izomera.¹⁶ Najbolje rješenje bilo je izolirati optički aktivan tiroksin iz štitne žlijezde. Provedeno je mnogo eksperimenata kako bi se to uspjelo postići. Obzirom da i 3,5-dijodtirozin i tiroksin imaju dva atoma joda na benzenskom prstenu, nije bilo iznenađujuće kako se oba spoja raspadaju prilikom kuhanja u kiselinama. To je onemogućilo kiselu hidrolizu tiroksina. Pretpostavljalo se da su potrebni žestoki uvjeti hidrolize pa je sljedeći korak bila enzimska hidroliza. Jedan od glavnih problema ovog pristupa bio je taj da djelovanje enzima tripsina na uzorak za posljedicu ima pretvaranje veće ili manje količine joda iz štitne žlijezde u jodide.^{17,18} Ubrzo, znanstvenici su morali promijeniti pristup. Odlučeno je da će pokušati rezoluciju racemičnog tiroksina na D- i L-izomer.¹⁹

Priprema i pročišćavanje soli tiroksina otežana je jer je tiroksin dosta slabo topljiv, odnosno ne otapa se bez rizika da izgubi jod. Upravo je to bila glavna prepreka u rezoluciji DL-tiroksina. Prvo su odlučili provesti rezoluciju DL-3,5-dijodtironina na optički aktivne komponente i zatim ih jodirati do odgovarajućeg optički aktivnog tiroksina. Zagrijavanje DL-dijodtironina s metanskom kiselinom rezultiralo je formiliranim derivatom koji je bio dobro topljiv u etanolu, a gotovo netopljiv u vodi. Pokušalo se prirediti soli ovog spoja s alkaloidima, kao što su strihnin i brucin, za koje je bilo poznato da su korisne u rezoluciji formiliranih derivata DL-aminokiselina. Takve soli bile su gotovo potpuno netopljive u vodi, slabo topljive u etanolu. Izdvajale su se iz otopine u obliku ulja i njihova kristalizacija nije bila moguća.¹⁵ Razmišljanja su krenula u smjeru korištenja baze manje molekulske mase što je dovelo do upotrebe α -feniletilamina i rezultiralo je djelomičnim uspjehom. Grijanjem kiseline (formiliranog derivata DL-3,5-dijodtironina (13)) i baze

(α -feniletilamina) u velikom volumenu vode i zatim hlađenjem izolirana je sol sa 70%-tnim iskorištenjem. Netopljivu frakciju nije bilo moguće dobiti kao optički čistu nakon prekrystalizacije. U matičnici je zaostala topljiva frakcija koja se nakon dvije prekrystalizacije činila čistom (**14**).¹⁹ Formilna skupina uklonjena je hidrolizom uz bromovodičnu kiselinu, a izolirani optički aktivan 3,5-dijodtironin jodiran je kako je opisano ranije.⁸ Obzirom da netopljiva frakcija nije mogla biti pročišćena bilo je neophodno iskoristiti dva optički aktivna izomera baze. Tako je uz L- α -feniletilamin dobiven L-tiroksin (**1**) (levotiroksin) što je prikazano shemom 4., a uz D- α -feniletilamin dobiven je D-tiroksin. Oba izomera analizirana su i istražena su im optička svojstva.²⁰

6,1 g formil-DL-3,5-dijodtironina prevedeno je u sol uz L- α -feniletilamin. Masa topljive frakcije iznosila je 2,5 g i imala $[\alpha]^{22} = +22,0^\circ$ ($c = 5$ u 50%-tnom etanolu). Nakon dvije prekrystalizacije iz vode dobiven je spoj s $[\alpha]^{22} = +23,8^\circ$ pri istim uvjetima.¹⁶ Kristalizirao je u obliku finih, bezbojnih, igličastih kristala koji nisu sadržavali kristalnu vodu i talili su se na temperaturi od 188-189 °C. Konačni produkt, L-tiroksin (levotiroksin) dobiven je jodiranjem i pročišćen kao natrijeva sol.⁴ Levotiroksin dobiven ovakvim postupkom tali se pri 235-236 °C uz raspadanje. 0,66 g levotiroksina otopljeno je u 13,03 g etanola uz 6,07 g NaOH ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$). Pri ovim uvjetima ima $[\alpha]^{21} = -3,2^\circ$.

Na sličan način dobiven je i analiziran D-tiroksin. D-Tiroksin tali se pri 237 °C uz raspadanje. 0,74 g D-tiroksina otopljeno je u 14 g etanola uz 6 g NaOH ($c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$). Pri ovim uvjetima ima $[\alpha]^{21} = +2,97^\circ$.¹⁵ Brojčane vrijednosti zakretanja ravnine polariziranog svjetla uzoraka dobivenih ovim eksperimentom iznenađujuće su niske. Moguće je da je došlo do djelomične racemizacije prilikom konačnog jodiranja dijodtironina u tiroksin. Kako bi se ovaj korak bolje kontrolirao proveden je novi eksperiment u kojem je L-tirozin jodiran, a rezultirajući 3,5-dijodtirozin reducirao ponovno u tirozin protresanjem u lužnatoj otopini uz H_2 i Pd- CaCO_3 . Ovako dobiven tirozin pokazivao je isto zakretanje zrake polariziranog svjetla kao i početni materijal. Ova činjenica iskorištena je u zaključku da analogija vrijedi i u pripravi tiroksina, odnosno da nije došlo do racemizacije prilikom ugradnje posljednja dva atoma joda u tiroksin.¹⁹



Shema 4. Sinteza L-tiroksina.

Provedena su dodatna istraživanja učinka levotiroksina i D-tiroksina. Uzorci optički aktivnih izomera tiroksina koje je priredio C. R. Harington¹⁹ korišteni su za testiranje njihovog efekta na rast punoglavaca i potrošnju kisika kod štakora. Pokazano je da pri određenim uvjetima efekt tiroksina na punoglavce može biti korišten kao specifični kvantitativni test za tiroksin. Punoglavci se inkubiraju u serijama od njih 12 u razrijeđene otopine testirane tvari u periodu od 24 sata. Zatim se drže u vodovodnoj vodi različito vrijeme ovisno o seriji. Provedeno je mnogo ovakvih testova i rezultat je bio taj da i L-tiroksin i D-tiroksin u malim koncentracijama imaju velik utjecaj na rast i razvoj punoglavaca. Također, uočeno je da L-tiroksin taj efekt daje pri nižim koncentracijama od D-tiroksina.²¹ Drugo istraživanje provedeno je na štakorima. Proučavan je unos kisika metodom koju su razvili Richards i Collison.²² Metoda omogućuje kontinuirano praćenje potrošnje kisika i kretanja životinje. Za bazalnu potrošnju kisika odabrani su periodi kada se životinja nije kretala (potrošnja kisika u uvjetima potpunog mirovanja u budnom stanju). Štakori su držani bez hrane svaku noć, ujutro su izvagani i određena je bazalna potrošnja kisika. Nakon toga ubrizgan im je tiroksin pod kožu. Uočeno je da ovo ubrizgavanje tiroksina rezultira povećanom potrošnjom kisika koja traje 3-14 dana. Također, uočeno je da je L-tiroksin oko tri puta potentniji od D-tiroksina.²² Ako pretpostavimo da je D-tiroksin neaktivan, ovaj rezultat bi implicirao da je svaki izomer bio onečišćen s 25% drugog. Ono što sa sigurnošću možemo reći jest da je levotiroksin fiziološki aktivniji oblik i stoga vjerojatno izomer koji se prirodno pojavljuje u štitnoj žlijezdi.¹⁹

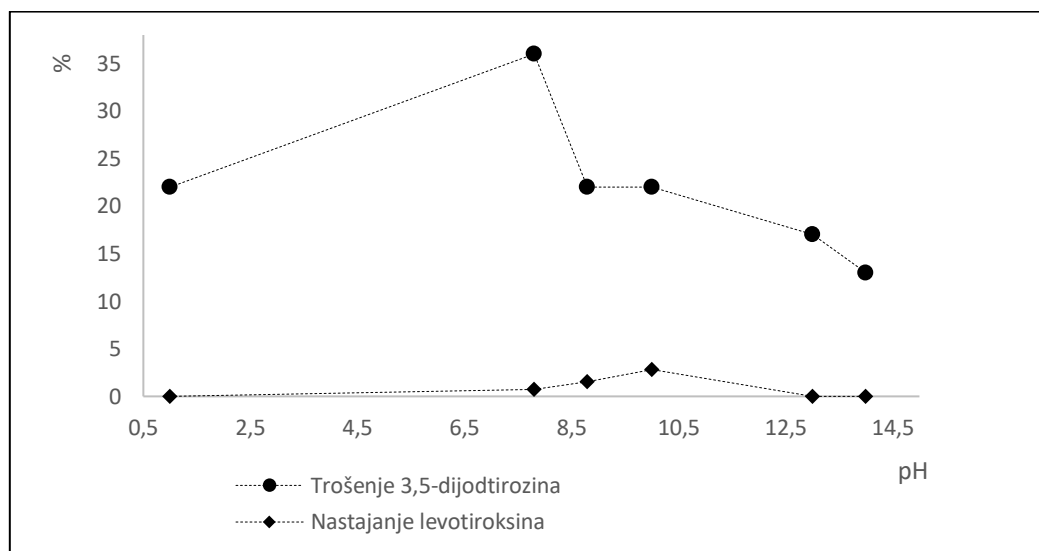
2.5. Razvoj sinteze – kako poboljšati iskorištenje?

2.5.1. Sinteza levotiroksina iz 3,5-dijodtirozina

Nakon prve uspješne sinteze, analize i rezolucije levotiroksina, znanstvenike je zanimalo postoji li bolji način za sintezu ciljanog spoja. Von Mutzenbecher je 1939. godine iznio opažanje kako inkubacija 3,5-dijodtirozina u lužnatoj otopini spontano daje levotiroksin u tragovima.²³ Kako u tom eksperimentu nije korišten potpuno čist 3,5-dijodtirozin pretpostavljeno je da neidentificirana nečistoća igra ulogu u niskim iskorištenjima. Eksperiment je ponovljen koristeći 14 g potpuno čistog 3,5-dijodtirozina sintetiziranog metodom koju su razvili Harington i McCartney.²⁴ 3,5-Dijodtirozin otopljen je u lužini i inkubiran 14 dana pri 37°C. Nakon zakiseljavanja i obrade taloga provedena je ekstrakcija butan-1-olom kako je opisao von Mutzenbecher.^{23,25} Daljnjom obradom priređena je kalijeva sol levotiroksina koja je kristalizirala iz otopine. Prije analize produkt je prekrystaliziran. Analizom je ustanovljeno da je eksperimentalni udio joda u produkt 65,38%, što je odgovaralo teorijskom udjelu od 65,34%. Također, određeno je talište produkta koje je odgovaralo talištu levotiroksina (233 °C). Ovim eksperimentom potvrđeno je da *in vitro* dolazi do pretvorbe 3,5-dijodtirozina u levotiroksin uz sintetski dobiven 3,5-dijodtirozin kao početni spoj.²⁵

1939. Ludwig i von Mutzenbecher uočili su da jodiranje određenih proteina u kontroliranim uvjetima rezultira s više produkata iz kojih se može izolirati levotiroksin. Ovo se može objasniti na dva način: ili su tretirani proteini otprije sadržavali tironin kao neprepoznati supstituent koji je onda jodiranjem direktno preveden u levotiroksin, ili su tirozini u proteinima jodirani do 3,5-dijodtirozina iz kojih je onda dijelom nastao levotiroksin.²⁶ Kao što je već ranije opisano, mnogi znanstvenici su podržavali drugo objašnjenje^{8,23,26,27} Pojavili su se pravi, eksperimentalni dokazi kako do pretvorbe 3,5-dijodtirozina u levotiroksin dolazi oksidacijom. Prvo je uočeno da prilikom inkubacije 3,5-dijodtirozina u lužnatoj otopini u potpunom odsutstvu kisika ne dolazi do spontanog nastanka levotiroksina.²⁷ Krenula su daljnja istraživanja u tom smjeru. Pretpostavljalo se da u procesu oksidacije sudjeluje aminokiselina u obliku fenoksidnog iona u uvjetima *in vivo* i onima koje je postavio von Mutzenbecher, odnosno da bi pri tim uvjetima fenolna skupina 3,5-dijodtirozina bila ionizirana u visokoj mjeri obzirom da joj *pK* iznosi 6,5.²⁸ Prvo se istražio efekt pH na nastajanje levotiroksina prilikom inkubacije 3,5-dijodtirozina na 38°C u periodu od 14 dana. Rezultati ekperimenta prikazani su grafički na slici 4.²⁷ U kiseljoj otopini uopće ne dolazi do nastanka levotiroksina, povećanjem pH dolazi do postupnog nastajanja levotiroksina do pH = 10, gdje postoji maksimum. Daljnjim povećanjem

pH, količine nastalog levotiroksina naglo padaju. Nastajanje levotiroksina započinje pri pH = 7,8 kada je u smjesi prisutan jedan ekvivalent baze, a maksimum se postiže pri pH = 10, nakon što je u smjesu dodano 1,95 ekvivalenata baze. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavku da je fenolna skupina ionizirana u ovom procesu.²⁷

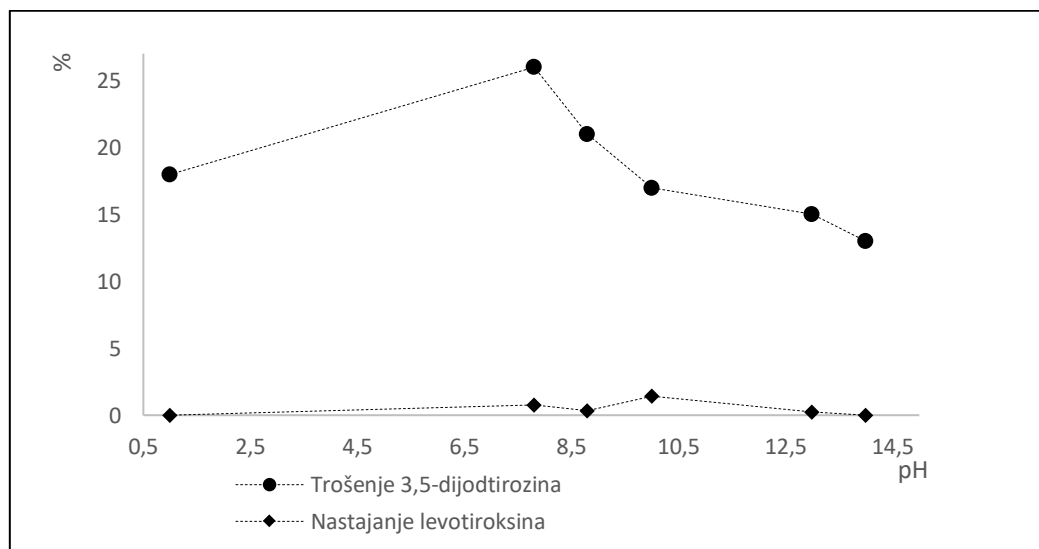


Slika 4. Nastajanje levotiroksina prilikom inkubacije na 38°C u periodu od 14 dana u ovisnosti o pH.²⁷

Nadalje, ako je nastajanje levotiroksina iz 3,5-dijodtirozina oksidativni proces, trebalo je biti moguće reakciju ubrzati i dobiti bolja iskorištenja uz dodatak prikladnog oksidacijskog sredstva. Johnson i Tewkesbury su predložili da ovaj proces pokazuje sličnosti s određenim reakcijama koje su proučavali Pummer i suradnici 1922. i 1925. godine u svom istraživanju oksidacije fenola heksacijanoferatom(III) u bazičnoj otopini.²⁹⁻³¹ Dodatak heksacijanoferata(III) trebao bi ubrzati reakciju i produkt bi trebao biti izoliran u većem iskorištenju. Međutim, svi eksperimenti bili su potpuno neuspješni. U najblažim uvjetima koje su mogli provesti došlo je do uništenja 3,5-dijodtirozina i nastanka smolastih produkata.²⁷ Otprilike u isto vrijeme, Barkdoll i Ross dobili su slične rezultate.³² Uz heksacijanoferat(III) nije bilo moguće dobiti levotiroksin niti bilo koji drugi oksidacijski produkt.

Kao alternativno oksidacijsko sredstvo izabran je vodikov peroksid i to prvenstveno zato što je otprije poznato da dodatak vodikovog peroksida simulira uvjete bioloških oksidacija. Proveden je niz eksperimenata pri različitim pH uz dodatak vodikovog peroksida čiji su rezultati prikazani grafički na slici 5.²⁷ Pokazano je da vodikov peroksid ubrzava reakciju nastajanja levotiroksina iz 3,5-dijodtirozina prilikom inkubacije na 38°C u periodu od 15 sati.

Ako usporedimo slike 4 i 5 uočavamo kako su potrošnja 3,5-dijodtirozina i količina nastalog levotiroksina istog reda nakon 15 sati inkubacije uz vodikov peroksid i 14 dana inkubacije bez vodikovog peroksida. Efekt pH sličan je u oba slučaja.²⁷



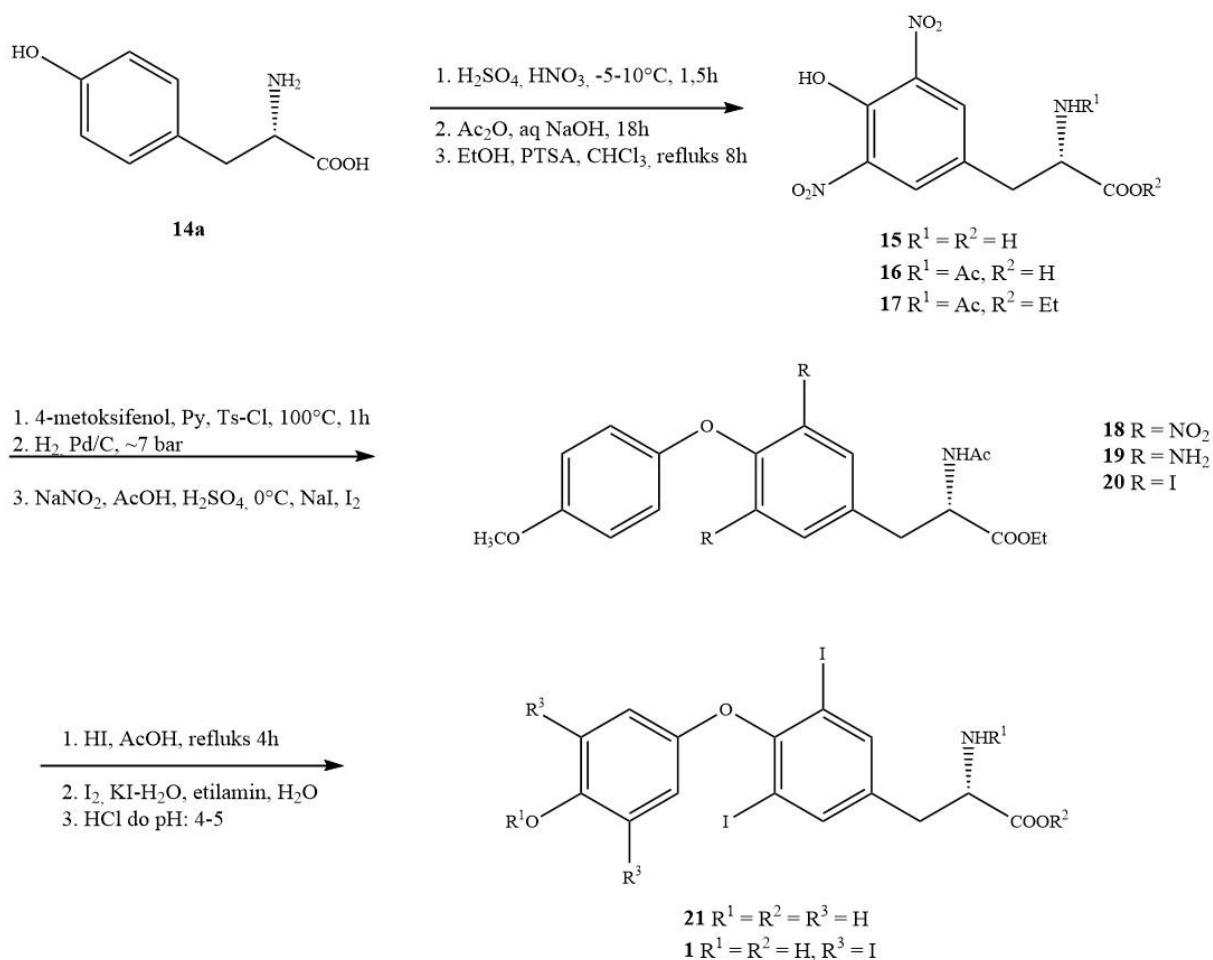
Slika 5. Oksidacija 3,5-dijodtirozina u levotiroksin vodikovim peroksidom (0,5 atomskih ekvivalenata kisika) u periodu od 15 sati pri 38°C.²⁷

Dodatak vodikovog peroksida u suvišku (5 atomskih ekvivalenata kisika) i podizanje temperature na 90-100°C rezultiralo je bržom reakcijom, bržim trošenjem 3,5-dijodtirozina, ali konačna iskorištenja ostala su ista. Zaključeno je kako pri ovim uvjetima nije moguće izolirati više levotiroksina jer je moguće da nastali levotiroksin podliježe razaranju vodikovim peroksidom.²⁷

Leland i Foster uočili su da je iz bazične otopine koja sadrži levotiroksin i 3,5-dijodtirozin moguće preferentno ekstrahirati levotiroksin koristeći butan-1-ol.³³ Provedeni su novi eksperimenti oksidacije 3,5-dijodtirozina vodikovim peroksidom tako da su reaktanti protresani s butan-1-olom. Ovom metodom maksimalno iskorištenje reakcije bilo je više od svih do tada provedenih eksperimenata.²⁷

2.5.2. *Sinteza levotiroksina iz L-tirozina*

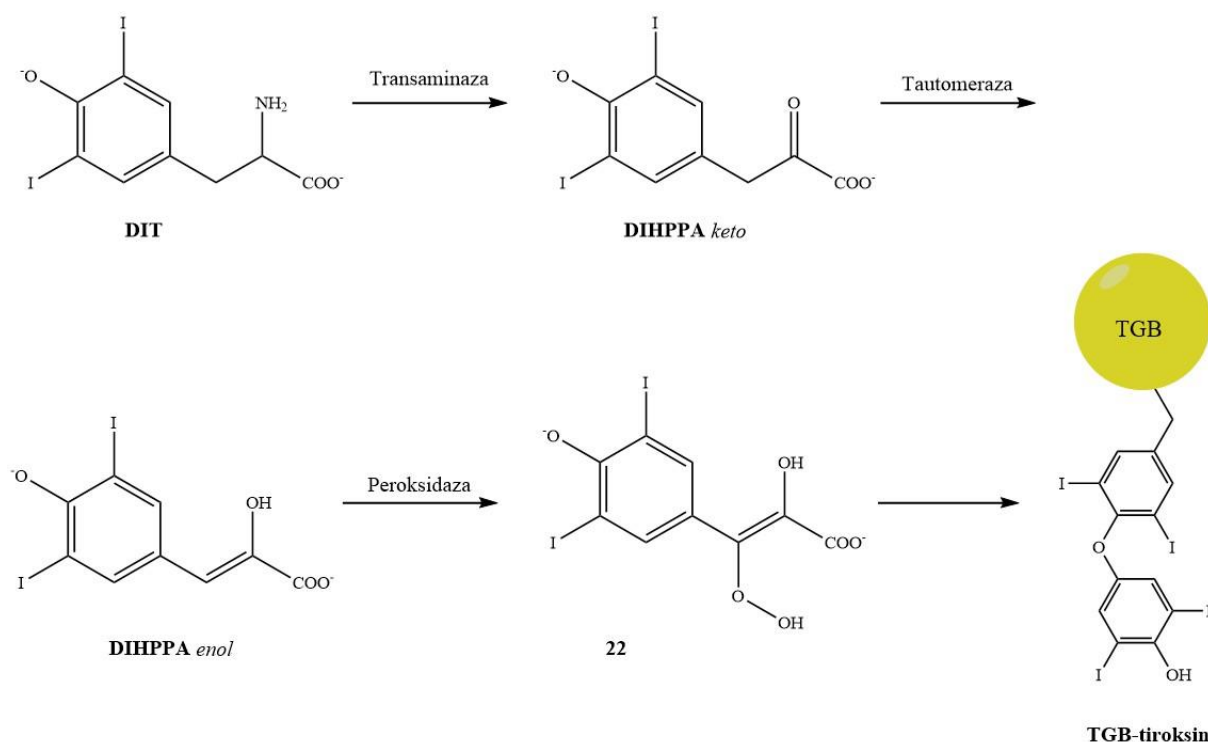
Znanstvenici su ubrzo dobili ideju da bi trebalo biti moguće pripremiti levotiroksin iz L-tirozina. Chalmers i suradnici zaključili su kako bi mogli provesti navedenu sintezu modificirajući otprije poznatu metodu sinteze DL-tiroksina koju su razvili Borrows, Clayton i Hems.³⁴ Prvi problem bio je kako zaštititi amino i karboksilnu skupinu L-tirozina. Zaštita formiranjem hidantionskog prstena nije bila moguća jer zadnja konverzija hidantiona u aminokiselinu rezultira racemizacijom.^{34,35} U ovoj sintezi, prikazanoj shemom 5, L-tirozin (**14a**) prvo je nitriran pomoću smjese sumporne i dušične kiseline pri čemu je nastao odgovarajući 3,5-dinitrotirozin (**15**) u 87%-tnom iskorištenju. Daljnjim reakcijama dobiven je dinitro-tirozinski derivat **20** uz iskorištenje od 82%. Obje nitro skupine prvo su reducirane, nakon čega je slijedila diazotizacija nastalog anilina, a daljnji tretman jodom rezultirao je derivatom L-dijodtironina uz iskorištenje od 82%. Zatim je provedena hidroliza jodovodičnom kiselinom i jodiranje spoja, čime je dobiven levotiroksin.³⁵ Koristeći L-tirozin kao početni spoj, Chalmers i suradnici postigli su ukupno iskorištenje od 25%, izolirali su ukupno 29 g levotiroksina u prirodnoj L-formi, bez značajnog stupnja racemizacije. Ova grupa istraživača priredila je i natrijevu sol L-tiroksina i odredila da kristalizira kao hidrat s pet molekula vode. Natrijeva sol levotiroksina koristi se i danas kao aktivna tvar u farmaceutskim pripravcima za liječenje hipotireoze.¹



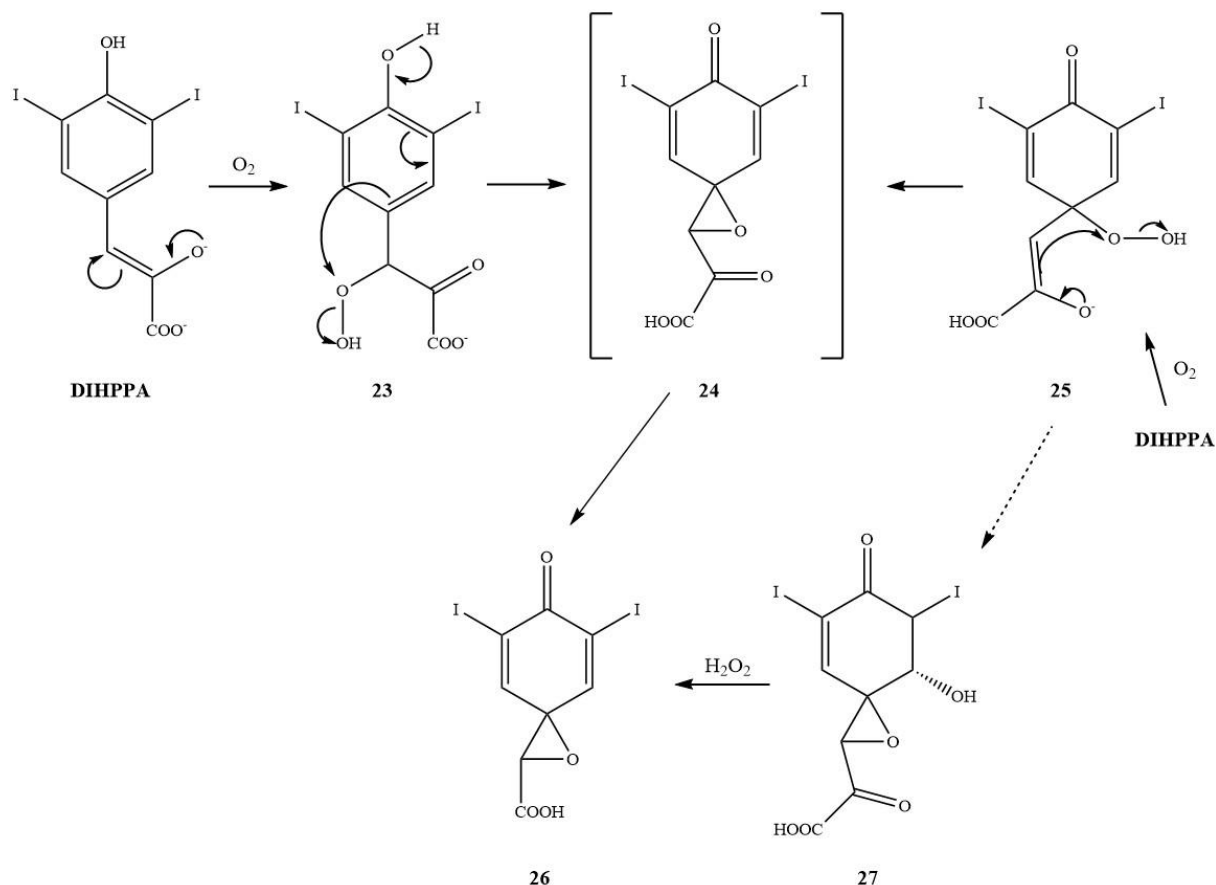
Shema 5. Sinteza levotiroksina iz L-tirozina.

2.5.3. Moderniji pristup sintezi levotiroksina

Tijekom 1990-tih godina, provedena su nova istraživanja o efikasnijoj sintezi levotiroksina. Sih i suradnici prvo su proučavali modelne reakcije biosinteze levotiroksina i identificirali ključne međuprodukte.³⁶ Mehanizam biosinteze levotiroksina nije potpuno istražen i znanstvenici su se složili kako su moguće dva modela: intramolekulska kondenzacija i intermolekulska kondenzacija.¹⁰ Intermolekulska kondenzacija temelji se na otkriću da 3,5-dijod-L-tirozin (DIT) brzo reagira sa svojim keto analogom: 4-hidroksi-3,5-dijodfenilpiruvatom (DIHPPA) pri čemu nastaje levotiroksin.³⁷ Blasi i suradnici predstavili su mogući model biosinteze levotiroksina u štitnoj žlijezdi uz postulat koji govori da DIHPPA može nastati iz DIT-a u reakciji koju katalizira enzim tirozin-transaminaza (shema 6).³⁸

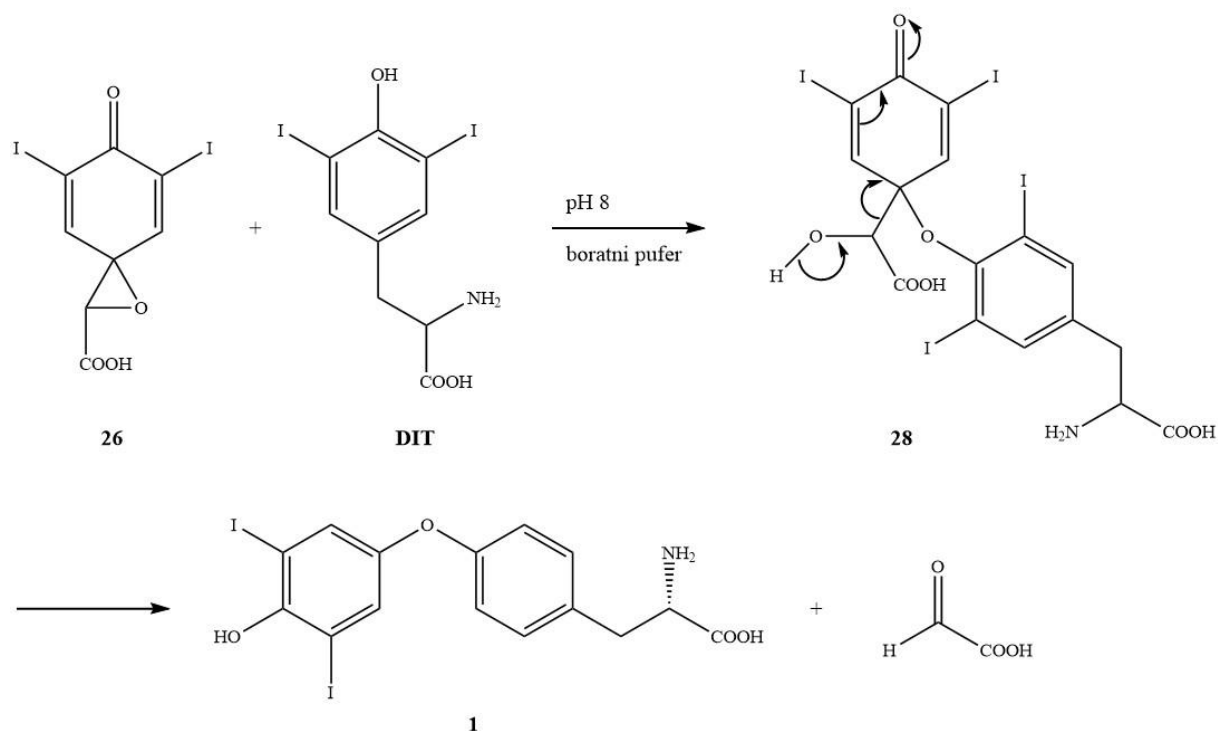
Shema 6. Blasijev intermolekulski model biosinteze levotiroksina.³⁸

Sih i suradnici odlučili su preispitati kemijski identitet međuprodukta (**20**) kako bi lakše shvatili mehanističku osnovu neobično lake reakcije između DIT-a i navedenog međuprodukta pri čemu nastaje levotiroksin.³⁶ DIHPPA je podvrgnuta oksigenaciji u boratnom puferu (pH 7,5) pri uvjetima koje je opisao Cahnmann.³⁹ Tom oksidacijom nastala je kompleksna smjesa produkata koja je analizirana HPLC-om. Kromatogram se sastojao od šest pikova.³⁶ Spojevi kojima odgovaraju pikovi 3 i 5 potpuno su se raspadali do 4-hidroksi-3,5-dijodbenzaldehida (DIHBA) i 3,5-dijod-1,4-benzokinona (DIBQ) u roku od 24 sata pri 24°C. Samo su oni reagirali s DIT-om pri čemu je nastao levotiroksin. Spojevi kojima odgovaraju pikovi 1, 2 i 4 raspadali su se sporije i to samo do DIHBA. Glavni produkt, onaj kojemu odgovara peti pik u kromatogramu, reagirao je s DIT-om i nakon 3 sata miješanja reakcijske smjese pri temperaturi od 24°C nastao je levotiroksin u iskorištenju većem od 85%. Svi produkti analizirani su i tehnikom NMR, te na temelju ¹H i ¹³C spektara predložene njihove strukture. Na temelju tih rezultata predložena su dva moguća puta oksigenacije DIHPPA prikazana na shemi 7: oksigenacija *ipso* položaja pri čemu nastaje spoj **25** ili hidroperoksigenacija benzilnog položaja pri čemu nastaje spoj **23**. Oba spoja su prekursori za spoj **24** iz kojeg nastaje epoksid **26**. Dio spoja **25** prelazi u epoksid **27** koji također može preći u epoksid **26**.³⁶



Shema 7. Produkti dobiveni oksigenacijom DIHPPA.

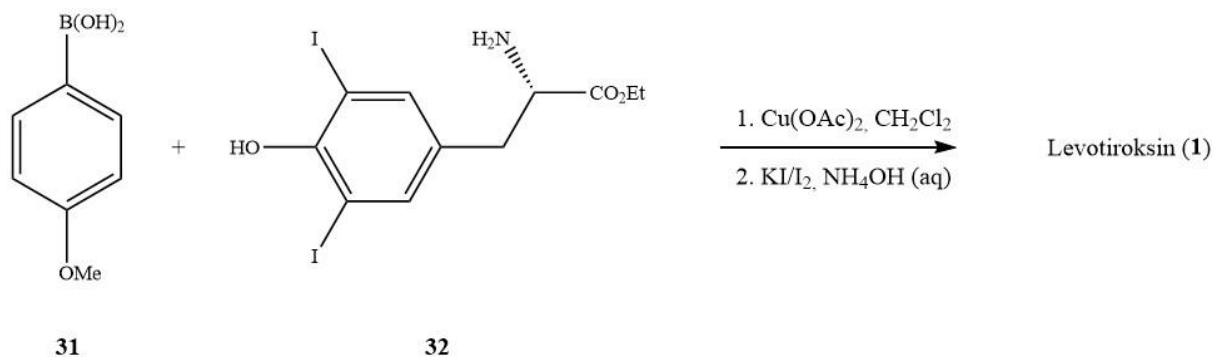
Ovo istraživanje dalo je prvi eksperimentalni dokaz da međuprodukt u sintezi levotiroksina nije 3-(4-hidroksi-3,5-dijodfenil)-3-hidroksiperoksi-2-oksopropanska kiselina (**23**) kao što se smatralo prije, nego su to epoksidi **26** i **27**. Sada je moguće objasniti naglašenu kemijsku reaktivnost prekursora levotiroksina: elektrofilni C atomi spojeva **26** i **27** olakšavaju S_N2 napad DIT-a pri čemu nastaju nestabilni vinilozi β -hidroksiketona,^{40,41} koji zatim spontano podliježu reverznoj aldolizaciji i nastaje levotiroksin uz izdvajanje C_2 jedinice.³⁶ Reakcija prikazana na shemi 8 bez problema se odvija na sobnoj temperaturi i neutralnom pH, što jako sugerira na sudjelovanje DIHPPA u biosintezi levotiroksina.³⁶



Nastavno na ovo istraživanje, Sih i suradnici predložili su novi put sinteze levotiroksina. 4-Hidroksi-3,5-dijodbenzaldehyd (**29**) prvo je reduciran u odgovarajući alkohol. Nakon toga slijedila je oksidacija do epoksida **30**, potom je provedena reakcija epoksida **30** s DIT-om u boratnom puferu pri pH 8. Opisana reakcija prikazana je na shemi 9. Nastali levotiroksin izoliran je u 94%-tnom iskorištenju, što ukazuje na odlično postavljanje reakcijskih uvjeta kao i ispravno odabrane reaktante.⁴²

Evans i suradnici kasnije su opisali efikasnu sintezu levotiroksina kondenzacijom derivata aril-borne kiseline s derivatom L-tirozina kataliziranu bakrom (II). Reakcija

4-metoksifenilboronske kiseline (**31**) s *N*-acetil-3,5-dijod-L-tirozinom (**32**) uz bakrov (II) acetat u diklormetanu prikazana je na shemi 10. Iskorištenje reakcije iznosilo je odličnih 84%.⁴³



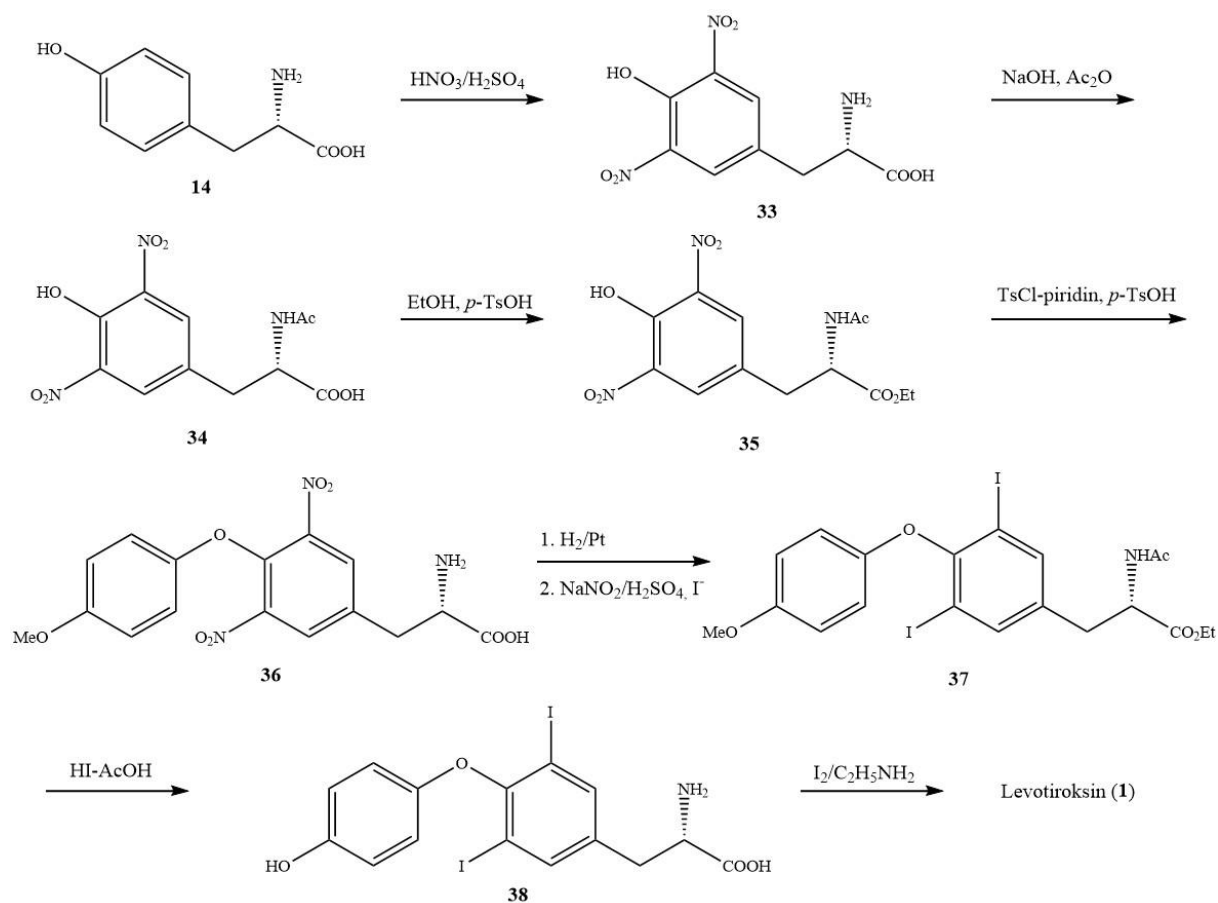
Shema 10. Sinteza levotiroksina iz 4-metoksifenilborne kiseline.

2.6. Proizvodnja levotiroksina na industrijskoj skali

Iako je kroz godine razvijeno nekoliko pristupa proizvodnje sintetskog hormona levotiroksina, dvije metode se ističu zbog inovativnosti, efikasnosti i mogućnosti prilagodbe za proizvodnju velikih količina.¹

Prva metoda je biomimetička i prvu su je predložili Harington i Barger još 1927. godine i ona je opisana ranije u ovom radu (§2.4.1.).⁴ Druga metoda je kemijska sinteza koja koristi L-tirozin kao kiralni predložak i opisana je od strane Chalmersa i suradnika.⁴⁴

Na shemi 11 prikazana je potpuna sinteza levotiroksina iz L-tirozina koju su razvili Chalmers i suradnici. L-tirozin prvo je bilo potrebno prevesti u 3,5-dinitro-L-tirozin (**33**) što se pokazalo zahtjevnijim nego što su očekivali. U to vrijeme bile su poznate dvije metode. Johnson i Kohmann predstavili su metodu 1915. godine, ali proces je bio dugačak, izolacija spoja poprilično naporna, a iskorištenja izuzetno loša. Drugu metodu razvili su Waser i suradnici, a sastojala se od dodavanja L-tirozina u smjesu dušične i sumporne kiseline uz održavanje temperature ispod 0°C. Ova metoda pokazala se nepouzdanom. Naime, uz određene modifikacije produkt se mogao izolirati sa 70%-tnim iskorištenjem, ali ukoliko bi uvjeti reakcije čak i samo malo varirali, iskorištenje bi padalo na nulu. Konačno, zadovoljavajući rezultati postignuti su dodavanjem dušične kiseline u ohlađenu suspenziju L-tirozina u sumpornoj kiselini. Na ovaj način iskorištenja su iznosila 86% i reakcija je bila reproducibilna. Otapanje spoja **33** u lužini uz acetanhidrid rezultiralo je *N*-acetilnim derivatom **34** u 80%-tnom iskorištenju. Ester **35** dobiven je u visokom iskorištenju u reakciji spoja **34** i alkohola u prisutstvu *p*-toluensulfonske kiseline uz azeotropno uklanjanje vode kloroformom. Nakon prevođenja estera **35** u etil-3,5-dinitro-4-*p*-metoksifenoksi-*N*-acetil-L-fenilalanilni ester (**36**), hidrogeniranja i tretiranja natrijevim nitritom uz dodatak jodida do jodiranog produkta **37**, koji u smjesi jodovodične i ledene octene kiseline daje 3,5-dijod-L-tironin (**38**) u visokom iskorištenju. 3,5-Dijod-L-tiornin (**38**) preveden je u levotiroksin (**1**) jodiranjem jodom u etil-aminu. Ovom metodom jodiranja ne dolazi do nastanka eksplozivnih dušikovih jodida. Ukupno iskorištenje iznosilo je 26%.⁴⁴ Ova metoda primjenjiva je za proizvodnju levotiroksina u velikim količinama zato što je relativno brza i jeftina, a ukupno iskorištenje poboljšano je dodatnom optimizacijom uvjeta i razvojem metoda izolacije međuprodukata.¹

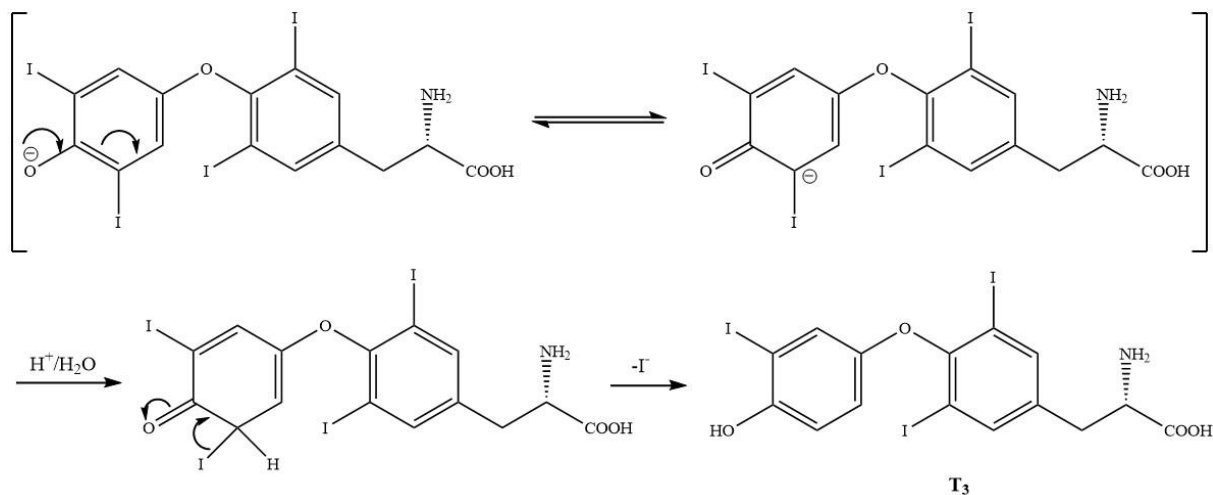


Shema 11. Sinteza levotiroksina koja se primjenjuje za proizvodnju na industrijskoj skali.

Jedna od ključnih transformacija u sintezi levotiroksina je priprava bifenilnog etera. Uz napredak novijih metodologija očekuju se elegantniji sintetski ili enzimatski procesi sinteze ovog važnog hormona.¹

2.7. Dejodiranje levotiroksina

Levotiroksin podliježe dejodiranju pri čemu nastaje 3,5,3'-trijodtironin (T_3). Dejodiranje se uglavnom pojavljuje u otopini, a razina degradacije povećava se kako medij postaje kiseli. Od ukupno četiri joda u strukturi, oni na položajima 3' i 5' labilniji su od onih na položajima 3 i 5. Fenoksidni ion kroz rezonanciju daje ugljicima na položajima 3' i 5' djelomičan anionski karakter pa su oni favorizirani za elektrofilni napad protona.^{1,45}



Shema 12. Dejodiranje levotiroksina, nastajanje 3,5,3'-trijodtironina.

Upravo zbog ovog procesa, prikazanog na shemom 12, ljudskom organizmu dovoljno je većinski sintetizirati levotiroksin. Levotiroksin nosi glavnu aktivnost, a 3,5,3'-trijodtironin koji je potreban u organizmu nastaje dejodiranjem samog levotiroksina. Također, u stanju hipotireoze kada štitna žlijezda ne proizvodi dovoljno levotiroksina i 3,5,3'-trijodtironina, dovoljna je zamjenska terapija samo levotiroksinom zbog procesa dejodiranja koji nastupa u organizmu.⁴⁶

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. S. R. Chemburkar, K. C. Demig, R. E. Reddy, *Tetrahedron* **66** (2010) 1955-1962.
2. J. Wolff, I. L. Chaikoff, *J. Biol. Chem.* **174** (1948) 555-564.
3. B. G. Katzung, S. B. Masters, A. J. Trevor, *Basic & Clinical Pharmacology*, Vol. 12, McGraw Hill, New York, 2012., str. 659-788.
4. H. Hashimoto, *Archiv für Klinische Chirurgie* **97** (1912) 219-248.
5. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-thyroxine#section=Safety-and-Hazards> (datum pristupa 22. srpnja 2018.).
6. Levothyroxine Sodium u *European Pharmacopoeia*, Vol. 8, str. 2618-2620.
7. <http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/UP-I-530-09-09-02-212.pdf> (datum pristupa 23. rujna 2018.).
8. C. R. Harington, G. Barger, *Biochem. J.* **21** (1927) 169-183.
9. P. Z. von Mutzenbecher, *Physiol. Chem.* **261** (1939) 253-256.
10. L. J. Degroot, H. Niepomniszcze, *Metab. Clin. Exp.* (1977) 665-718.
11. A. Taurog, M. Dorris, D. R. Doerge, *Arch. Biochem. Biophys.* **315** (1994) 82-89.
12. M. Häggström, *WikiJournal of Medicine* **1** (2014).
13. D. Dème, E. Fimiani, J. Pommier, J. Nunez, *Eur. J. Biochem.* **51** (1975) 329-336.
14. C. R. Harington, , *Biochem. J.* **20** (1926) 293-299.
15. H. Stephen, *J. Chem. Soc.* **127** (1925) 1874.
16. R. Hunt, *Amer. J. Physiol.* **63** (1922) 257-259.
17. C. R. Harington, *Biochem. J.* **20** (1926) 293-299.
18. A. Oswald, *Z. Physiol. Chem.* **62** (1909) 432-442.
19. C. R. Harington, *Biochem. J.* **22** (1928) 1429-1435.
20. E. C. Kendall, *J. Biol. Chem.* **19** (1914) 251-256.
21. J. H. Gaddum, *J. Physiol.* **64** (1927) 246-254.
22. A. N. Richards, L. W. Collison, *J. Physiol.* **66** (1928) 299-306.
23. P. von Mutzenbecher, *Hoppe-Seyl. Z.* **261** (1939) 253-256.
24. C. R. Harington, W. McCartney, *Biochem. J.* **21** (1927) 852-856.
25. P. Block, *J. Biol. Chem.* **135** (1940) 51-52.
26. P. von Mutzenbecher, W. Ludwig, *Hoppe-Seyl. Z.* **258** (1939) 195-211.

27. C. R. Harington, R. V. Pitt Rivers, *Biochem. J.* **39** (1945) 157-164.
28. P. S. Winnek, C. L. A. Schmidt, *J. Gen. Physiol.* **18** (1935) 892.
29. T. B. Johnson, L. B. Tewkesbury, *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* **28** (1942) 73-77.
30. R. Pummer, D. Melamed, H. Puttfarcken, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **55** (1922) 3116-3132.
31. R. Pummer, H. Puttfarcken, P. Schopflocher, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **58** (1925) 1808-1820.
32. A. E. Barkdoll, W. F. Ross, *J. Am. chem. Soc.* **66** (1944) 898-899.
33. J. P. Leland, G. L. Foster, *J. Biol. Chem.* **95** (1932) 165-179.
34. E. T. Borrows, J. C. Clayton, B. A. Hems, *J. Chem. Soc.* (1949) 185-190.
35. J. R. Chalmers, G. T. Dickson, J. Elks, B. A. Hems, *J. Chem. Soc.* (1949) 3424-3433.
36. V. B. Oza, G. M. Salamonczyk, Z-W. Guo, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 11315-11316.
37. G. Hillmann, B. Keil, P.Z. Tashimi, *Naturforsch* **16** (1961) 28-32.
38. F. Blasi, F. Fragomele, I. Covelli, *Endocrinology* **85** (1969) 542-551.
39. H. J. Cahnmann, K. Funakoshi, *Biochemistry* **9** (1970) 90-98.
40. D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, O. E. Edwards, *J. Chem. Soc.* (1956) 530-534.
41. A. R. Battersby, *Proc. Chem. Soc.* (1963) 189-500.
42. G. M. Salamonczyk, V. B. Oza, C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 6965-6968.
43. D. A. Evans, J. L. Katz, T. R. West, *Tetrahedron Lett.* **39** (1998) 2937-2940.
44. J. R. Chalmers, G. T. Dickson, J. Elks. B. A. Hems, *J. Chem. Soc.* (1949) 3424-3433.
45. C. M. Won, *Pharm. Res.* **9** (1992) 131-137.
46. A. Post, R. J. Warren, Sodium Levothyroxine u *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol 5, Academic, New York, 1976., str. 226-281.